

scFv Fc L H
scFv 1 Fc
1 IL-6

50

50

50

50

H ₁	V ₁	CDR1	SDHAWG							
H ₁	V ₁	CDR2	YI SYSGI TTYNPSLKS							
H ₁	V ₁	CDR3	SLARTTAMDY							
L ₁	V ₁	CDR1	RASQDI SSYLN							
L ₁	V ₁	CDR2	YTSRLHS							
L ₁	V ₁	CDR3	QOGNTLPYT							

10

scFv L V C IgG Fc

scFv N H V L V

20

GGGGS GGRAS GGGGS GGGGS

$\frac{8}{9} \times \frac{7}{8} = \frac{\cancel{8}}{\cancel{9}_3} \times \frac{\cancel{7}}{\cancel{8}_4} = \frac{1}{3} \times \frac{1}{4}$

[illegible]

$\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - y_i)$

[illegible][illegible]

40

(1) $\square \square \square \square - \square \square \square \square$

(2) □□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□

[illegible]

(1) $\square \vdash \square$

[illegible]

50

10

20

30

40

50

scFv (1) (G₁S) (GGRAS) (G₁S) (G₁S)₃

scFv H₁V₁ L₁V₁ N₁H₁V₁ - L₁V₁

H₂N- H₁V₁ - L₁V₁ - COOH

Y Y -

Fc CH₃ mini body Fc scFv CH₃ CH₁ CH₂ scFv CH₃ C H₁ CH₂

(1)-(4) N C

(1) H₁V₁

(2)

(3) L₁V₁

(4)

H₁V₁ H₁V₁ L₁V₁ - L₁V₁

pdCs- Fc- X (Protein Engineering vol. 11. pp495- 500, 1998) Fc (Cancer Res. Vol 60: 2167- 2177, 2000) Fc SS

10

20

30

40

50


```

framework region FR

```

CDR₁ CDR₂ FR₁ FR₂ PCR₁ PCR₂ CDR₃ FR₃ DNA₁ CDR₄ CDR₅ PCR₃ CDR₆ FR₄ FR₅ CDR₇ CDR₈ EP 239400 WO 96/02576 CDR₉ FR₆ CDR₁₀

10

L_H V_H FR₁ FR₂ FR₃ FR₄

H_L V_L FR₁ FR₂ FR₃ FR₄

20

RV_La RV_Hf

Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

RV_La RV_Hf

40

RV_La RV_Hf

50

□ □ □ □ □ □

□ □ □ □ □ □

□ □ □ □ □ □

□ □ □ □ □ □

□ □ □ □ □ □

□ □ □ □ □ □

psvzneo

☐ ☒ HLF- VIF-gy ☐ ☒ HLF- VL-grk

[illegible]

50

□ □ □ □ □ □

□ □ □ □ □ □

□ □ □ □ □ □

□ □ □ □ □ □

5555

□ □ □ □ □ □

on serotype 5 serotype 2 E1 reg

20

30

40

50

293 36 Kb linear DNA DNA AdEasy Adenoviral Vector System (Stratagene)

10 tet

20 (ex vi vo)

(i n vi vo)

30

(1)

(2)

(3)

Invitrogen CD34

40

293 American Type Culture Collection Manassas, VA

293 10% FCS DMEM

T KT-3 Shimizu S et al., Blood 1988; 72: 1826-1828

10% FCS 4 ng/ml IL-6 Ajinomoto Co., Inc., Kawasaki, Japan

RPM 1640 IL-6R sIL-6R

Chugai Pharmaceutical Co., LTD Roche Group, Shizuoka, Japan

50

Mediatech-Cellgro Kansas City, MO
 New England Biolabs Beverly, MA
 Promega Madison, WI
 Taq PCR QiAGEN Valencia, CA

IL-6

IL-6 cDNA
 VH VL PCR 1 PCR
 Fv canonical Fv boundary definition
 2 VH VL
 PCR 20 (G₄S)(GGRAS)(G₄S)₂
 DNA pOPE101
 scFv DNA 5' 3' Nco I
 Not I IL-6 pOPE101/scFv

scFv scFv DNA c-Myc
 6 pOPE101 PCR Sna BI 5
 ' Avr I 3' pPI C9 Invitrogen, Carls
 bad, CA IL-6 pPI C9/scFv Fc/
 IL-6 DNA
 γ-1 CH2 CH3 Fc fragment constan
 t IL-6 cDNA PCR
 1

Fc Igk V-J 2-C
 pSecTag2a Invitrogen IL-6
 scFv PCR /Fc
 IL-6 pSecTag/Fc/scFv CMV
 BGH pShuttle Stratagen
 e, La Jolla, CA IL-6 pShuttle/CMV/Fc/scFv
 elements elements

B pShuttle (Stratagene, La Jolla, CA)
 multiple cloning site pGL3basic Vector (Promega) SV40 late pol
 y A signal

A) IgG1 H C pBluescript II BamHI
 N SpeI

B) pBluescript II KpnI XhoI
 CMV

A) CMV- multiple cloning
 site -Fc B KpnI XbaI
 EcoRV, SpeI
 Fc
 -IL-6 pShuttle/CMV/Fc/scFv scFv EcoRV
 SpeI IL-6

10

20

30

40

50

AdEasy Stratagene IL-6 pAdEasy-1 BJ 5183 IL-6 DNA PCR Ad 293 Ad5/IL-6 rescue Maizel et al. 260nm 1 1.1×10^{12} v.p. 10

IL-6 Ad5/IL-6 10 T75 MOI 100 v.p./ Ad5/IL-6 293 37°C 1 3 PBS PBS Sigma St. Louis, MO Protein A Antibody Purification Kit IL-6 Bradford Bio-Rad 20

() IL-6 H L single chain fragment variant (IL-6 scFv) scFv IgG Fc New receptor inhibitor for IL-6 ()

(Ad CMV) A 30

()

IL-6 96 ELISA IL-6 MT-18 IL-6 IL-6 IL-6 MT-18 5 μ g/ml well 100 μ l TBS bovine serum albumin IL-6 sIL-6R ELISA sIL-6R 100 ng/ml well 100 μ l IL-6 IgG HRP conjugated anti-Fc fragment F(ab')₂ (Dako) OPD peroxidase substrate (Sigma) IL-6 IgG IL-6 IL-6 40

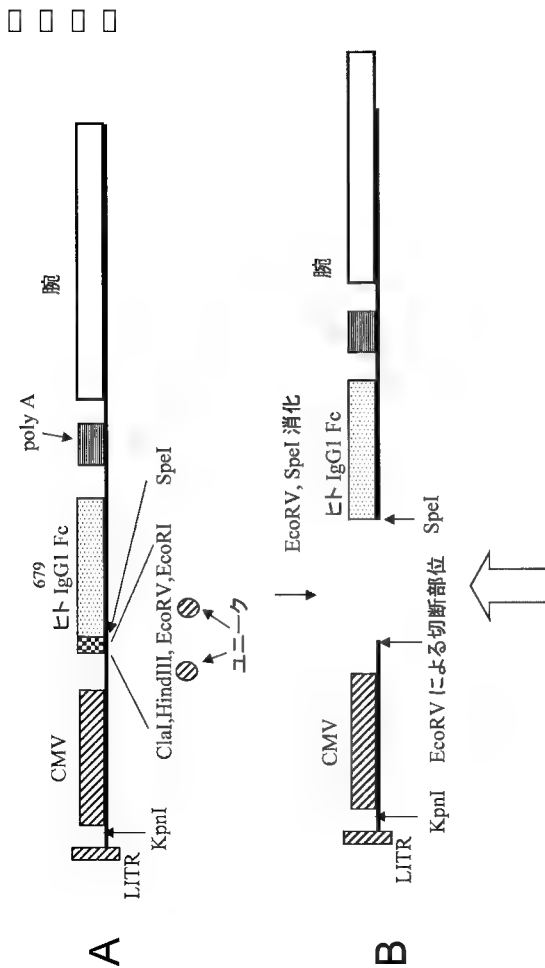
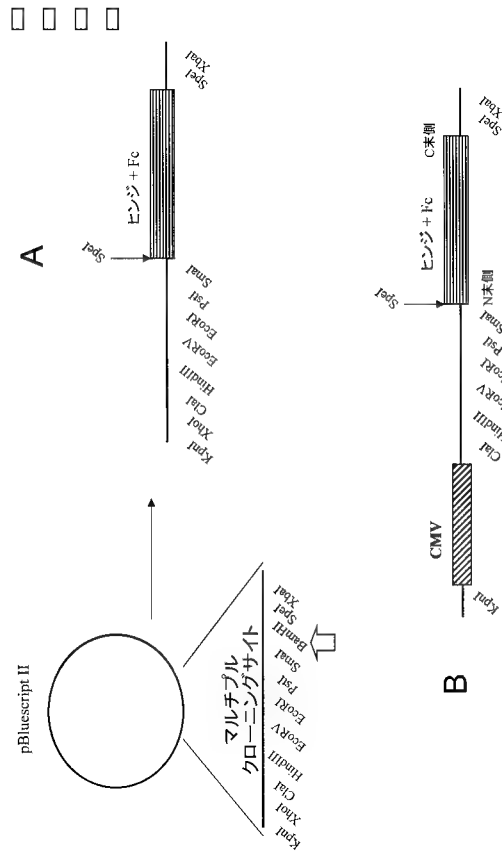
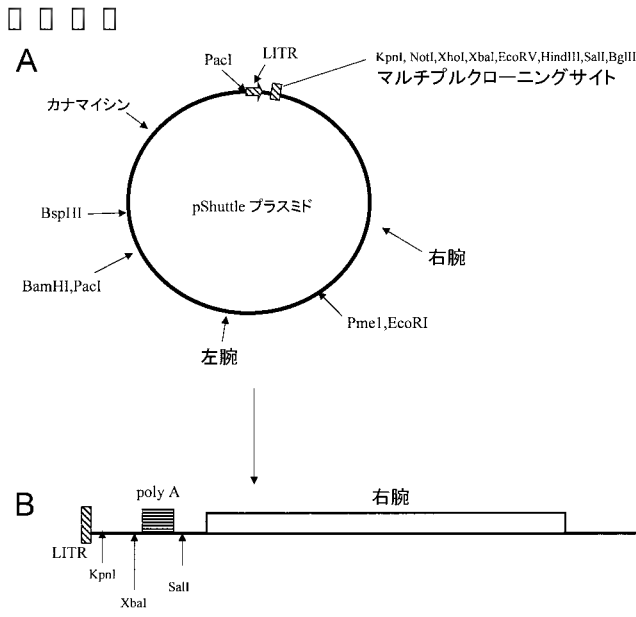
IL-6 IL-6 sIL-6R ELISA 10 ng/ml IL-6 50

IL-6 - IL-6
IL-6 - IL-6

IL-6 KT-3
IL-6 KT-3 10,000 cells/well
96well 500 pg/ml IL-6 KT-3
IL-6 IgG
MTS KT-3
IL-6

1. Cells were seeded into 96-well plates at a density of 1×10^4 cells per well. After 24 hours of attachment, the medium was replaced with serum-free DMEM. Cells were then treated with H2052 conditioned medium (CM) or recombinant human IL-6 (10 ng/ml) for 24 hours. The medium was then collected and stored at -80°C until analyzed.

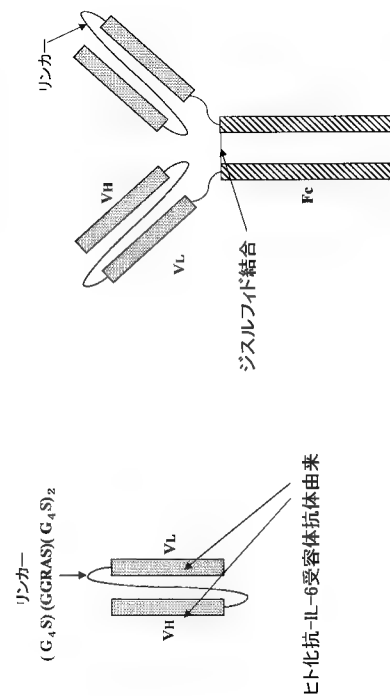
[illegible]

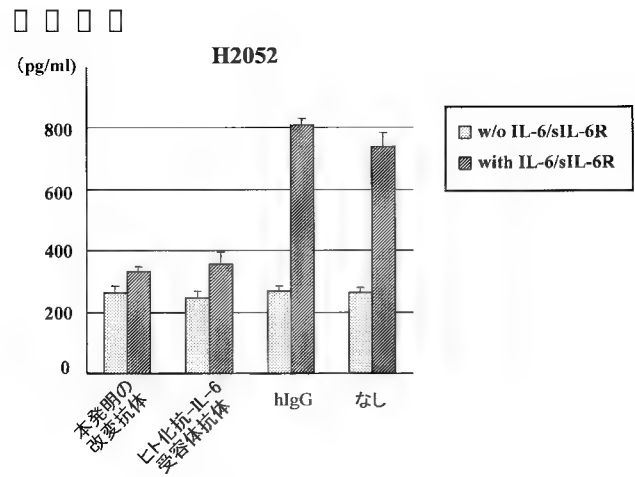
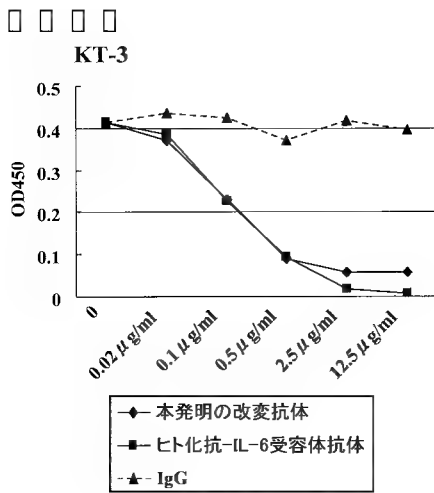
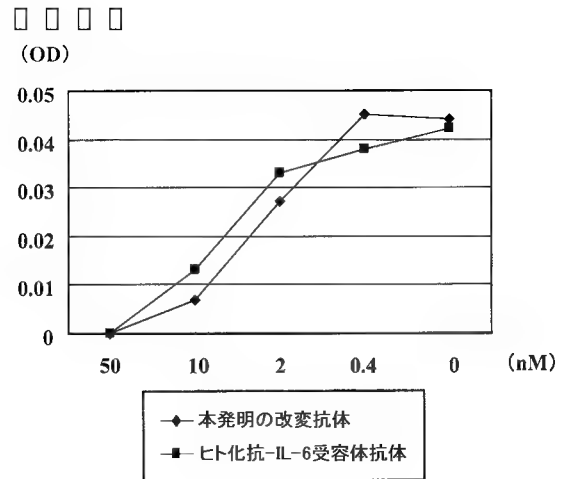
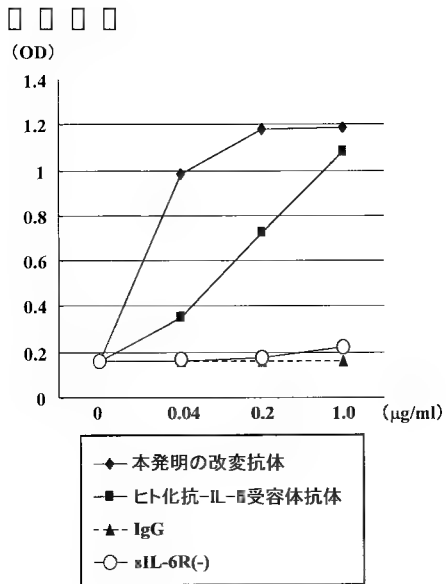


ヒト化抗-IL-6受容体抗体のscFv

□ □ □ □

ヒト化抗-IL-6受容体抗体のscFvの構造
(本発明における改変抗体)







□ □ □ □ □

2006046661000001. app

□ □ □ □ □ □ □ □

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/019820

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28 (2006.01), C12N15/00 (2006.01), C12P21/08 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61P29/00 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16/28 (2006.01), C12N15/00 (2006.01), C12P21/08 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61P29/00 (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAPLUS (STN), SwissProt/PIR/Geneseq, JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 92/19759 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 12 November, 1992 (12.11.92), Claims; sequence Nos. 54, 57 & JP 05-227970 A & US 5795965 A1 & EP 628639 A1	1-22, 26
Y	WO 2003/072134 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 04 September, 2003 (04.09.03), Claims & EP 1491209 A1 & US 2005/095242 A1	1-22, 26
Y	LIU J. et al., "pPIC9-Fc: a vector system for the production of single-chain Fv-Fc fusions in Pichia pastoris as detection reagents in vitro.", J.Biochem. (Tokyo), 2003, Vol.134, No.6, p.911-7.	1-22, 26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 November, 2005 (22.11.05)Date of mailing of the international search report
06 December, 2005 (06.12.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/019820

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ONO, K. et al., "Production of anti-prion scFv-Fc fusion proteins by recombinant animal cells.", J.Biosci.Bioeng., 2003, Vol.95, No.3, p.231-8.	1-22,26
Y	WU AM. et al., "Multimerization of a chimeric anti-CD20 single-chain Fv-Fc fusion protein is mediated through variable domain exchange.", Protein Eng., 2001, Vol.14, No.12, p.1025-33.	1-22,26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/019820

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 23-25

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 23-25 relate to a method of treating diseases caused by the action of interleukin-6, so that they pertain to methods for treatment of a human body by surgery or therapy and relevant diagnostic methods and thus relate to a subject matter which this International (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/019820

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Searching Authority is not required to search under the provisions
of PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2005/019820	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28 (2006.01), C12N15/00 (2006.01), C12P21/08 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61P29/00 (2006.01)			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28 (2006.01), C12N15/00 (2006.01), C12P21/08 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61P29/00 (2006.01)			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2005年 日本国実用新案登録公報 1996-2005年 日本国登録実用新案公報 1994-2005年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CAPLUS(STN), SwissProt/PIR/Geneseq, JSTPlus(JOIS)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	WO 92/19759 A1 (中外製薬株式会社) 1992. 11. 12, 特許請求の範囲, 配列番号 54, 配列番号 57 & JP 05-227970 A & US 5795965 A1 & EP 628639 A1	1-22, 26	
Y	WO 2003/072134 A (協和発酵工業株式会社) 2003. 09. 04, 特許請求の範囲 & EP 1491209 A1 & US 2005/095242 A1	1-22, 26	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 22. 11. 2005		国際調査報告の発送日 06. 12. 2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 晴絵 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2005/019820

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LIU J, et. al., "pPIC9-Fc: a vector system for the production of single-chain Fv-Fc fusions in Pichia pastoris as detection reagents in vitro." , J Biochem (Tokyo)., 2003, Vol. 134, No. 6, p. 911-7.	1-22, 26
Y	ONO K, et. al., "Production of anti-prion scFv-Fc fusion proteins by recombinant animal cells." J Biosci Bioeng. , 2003, Vol. 95, Np. 3, p. 231-8.	1-22, 26
Y	WU AM, et. al., "Multimerization of a chimeric anti-CD20 single-chain Fv-Fc fusion protein is mediated through variable domain exchange." Protein Eng. , 2001, Vol. 14, No. 12, p. 1025-33.	1-22, 26

様式 PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2005年4月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2005/019820

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT第17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 23-25 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲23-25は、インターロイキン6の作用に起因する疾患の治療方法に関するものであって、手術又は治療による人体の処置方法及び診断方法に該当し、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続表(2)) (2005年4月)

□ □ □ □ □ □ □ □ □ □

<div><div></div><div></div><div></div><div></div></div>	39/ 395
<div><div></div><div></div><div></div><div></div></div>	48/ 00
<div><div></div><div></div><div></div><div></div></div>	43/ 00
<div><div></div><div></div><div></div><div></div></div>	35/ 76
<div><div></div><div></div><div></div><div></div></div>	25/ 00
<div><div></div><div></div><div></div><div></div></div>	27/ 02
<div><div></div><div></div><div></div><div></div></div>	5/ 14
<div><div></div><div></div><div></div><div></div></div>	37/ 08
<div><div></div><div></div><div></div><div></div></div>	17/ 00

□	□	□	□	□
□	□	□	□	□

[illegible]